



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 22 385 A 1**

⑤1 Int. Cl. 5:  
**C 07 K 15/04**  
A 61 K 37/64

②1 Aktenzeichen: P 42 22 385.7  
②2 Anmeldetag: 8. 7. 92  
④3 Offenlegungstag: 13. 1. 94

DE 42 22 385 A 1

⑦1 Anmelder:

Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218  
Ingelheim, DE

⑦2 Erfinder:

Hofer, Franz, Dr., Wien, AT; Grünberger, Martin,  
Mag., Wien, AT; Machat, Herwig, Wien, AT;  
Küchler, Ernst, Prof. Dr., Wien, AT; Blaas, Dieter, Dr.,  
Wien, AT

⑤4 Verfahren zur Isolierung von Inhibitoren des Rhinovirus-Rezeptors

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse der Bindung von Rhinoviren der "kleinen Rhinovirus-Rezeptor-gruppe" an den LDL-Rezeptor. Insbesondere umfaßt sie eine Methode zur Isolierung von Substanzen, die sowohl diese Bindung als auch die Bindung physiologischer Liganden an den LDL-Rezeptor inhibieren und ein Verfahren zur Analyse des LDL-Metabolismus durch markiertes Rhinovirusmaterial.

DE 42 22 385 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11 93 308 062/282

13/56

Die Erfindung betrifft die Bindung humaner Rhinoviren an den LDL-Rezeptor und insbesondere ein Verfahren zur Isolierung von Substanzen, die die Bindung von Rhinoviren oder anderen Liganden des LDL-Rezeptors inhibieren.

Humane Rhinoviren repräsentieren eine große Gattung innerhalb der Familie der Picornaviren und schließen etwa 115 verschiedene Serotypen ein (Melnick, J.L. (1980) *Prog. Med. Virol.* 26, 214–232). Diese RNA-Viren befallen den Respirationstrakt des Menschen und verursachen akute Infektionen, die zu Erkältungskrankheiten führen.

Die humanen Rhinoviren können in zwei Gruppen unterteilt werden, wenn als Kriterium der Zuordnung die Kompetition um Bindungsstellen an der Oberfläche humaner Zellkultur-Zellen, wie z. B. HeLa-Zellen, herangezogen wird. Diese Experimente zeigen, daß – bis auf eine einzige Ausnahme (Serotyp 87) – zwei voneinander verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche existieren. Bisher konnten 91 Serotypen der "großen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" und 10 Serotypen der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" zugeordnet werden (Abraham, G. und Colonna, R.J. (1984) *J. Virol.* 51, 340–345; Uncapher et al. (1991) *Virology* 180, 814–817). Der Rezeptor der "großen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" wurde gereinigt und als ICAM-1 identifiziert, einem zur Immunglobulinsuperfamilie zugehörigen Protein, das als Zelladhäsionsmolekül fungiert (Tomassini, J. E. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4907–4911; Staunton, D.E. et al. (1989) *Cell* 56, 849–853; Greve, J. M. et al. (1989) *Cell* 56, 839–847). Durch den Nachweis einer spezifischen Bindung des gereinigten ICAM-1 an das Virus und durch die Fähigkeit durch Gentransfer die Rhinovirus-Bindungsaktivität auf Zellen zu übertragen, die vor dem Transfer keine entsprechende Aktivität besaßen, konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß ICAM-1 der Rezeptor für die Mehrzahl der Rhinoviren ist (Greve et al. (1989) loc. cit.; Staunton et al. (1989) loc. cit.). Außerdem konnte gezeigt werden, daß monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 die Bindung und Infektion von HeLa-Zellen durch Rhinoviren verhindern (Staunton et al. (1989), loc. cit.). Weiterhin können monoklonale Antikörper, die die Bindung von ICAM-1 zu Leukozyten via LFA-1 ("lymphocyte function associated antigen-1") – einem anderen natürlichen Liganden des ICAM-1 – inhibieren, auch die Rhinovirus-Bindung an den Rezeptor blockieren. Die LFA-1 und Rhinovirus-Bindungsstellen müssen also zumindest benachbart sein. Versuche mit chimären und mutierten ICAM-1-Molekülen zeigten zusätzlich, daß die Bindungsstelle für die Rhinovirus-ICAM-1 Wechselwirkung nicht mit der Bindungsstelle für LFA-1 zusammenfällt (Staunton, D. E. et al. (1990) *Cell* 61, 243–254).

Die Rezeptor-Bindungsstelle des menschlichen Rhinovirus Serotyp 14, einem Vertreter der "großen Rhinovirus-Rezeptorgruppe", liegt in einem sogenannten "Canyon", einer Vertiefung der Virusoberfläche (Rossmann, M.G. et al. (1985) *Nature* 317, 145–153). Dabei sind die Aminosäuren, die in diesem "Canyon" liegen, relativ stark konserviert, während die Aminosäuren in der Umgebung variabel sind und Bindungsstellen für neutralisierend wirkende Antikörper darstellen. Nach dieser "Canyon-Hypothese" können Viren Mutationen in den hypervariablen Antikörper-Bindungsstellen akzeptieren und so der natürlichen Immunantwort entgehen. Auf diese Weise bleibt eine konstante Rezeptor-Bin-

dungsstelle erhalten, die für Antikörper nicht zugänglich ist (Rossmann, M.G. und Palmenberg, A.C. (1988) *Virology* 164, 373–382).

Soweit bis heute bekannt, vermittelt der Rezeptor der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" die Aufnahme von etwa 10 Serotypen der humanen Rhinoviren in die entsprechenden Wirtszellen. Dieser membranständige Rezeptor wurde durch verschiedene Reinigungsschritte isoliert, wobei die Bindungsaktivität in den verschiedenen Fraktionen mittels eines Filterbindungs-Assays nachgewiesen wurde (Mischak, H. et al. (1988) *J. Gen. Virol.* 69, 2653–2656). Das scheinbare Molekulargewicht des nativen Rezeptors in Gegenwart von nichtionischen Detergentien (mittels Gelchromatographie bestimmt) entspricht etwa 450 kD, das der denaturierten Form etwa 120 kD, wobei jedoch auch eine Reihe anderer Formen gefunden wurde (Mischak, H. et al. (1988) loc. cit.). Außerdem stellte sich heraus, daß ein aus dem Zellkulturüberstand von HeLa-Zellen isoliertes Protein die Fähigkeit besitzt, Rhinoviren der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" zu binden (Hofer et al. (1992) *J. gen. Virol.* 73, 627–632).

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß das aus dem HeLa-Zellkulturüberstand isolierte Rezeptorprotein offensichtlich Teil des humanen LDL (low density lipoprotein)-Rezeptors ist. Dieser unerwartete Befund erlaubt überraschenderweise die Etablierung eines Verfahrens zur Isolierung von Substanzen, die die Bindung von Liganden an den LDL-Rezeptor inhibieren.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich demnach auf ein Verfahren, das es ermöglicht, den LDL-Rezeptor in Gegenwart einer potentiellen Inhibitorsubstanz mit markiertem Rhinovirusmaterial aus der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" zu inkubieren und das Ausmaß der Bindung zu bestimmen.

Dabei kann das Virusmaterial vollständige Rhinoviren, Rhinovirushüllen oder Rhinoviruskapsidpeptide mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor umfassen. Zum Beispiel kann es sich dabei um Material handeln, das vom humanen Rhinovirus Serotyp 2 (HRV2) abgeleitet ist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kommt als einzusetzender LDL-Rezeptor sowohl die aus den Kulturüberständen eukaryontischer Zellen isolierbare lösliche Form als auch die aus Zellmembranen isolierbare Rezeptorform in Frage.

Die Erfindung bezieht sich außerdem auf die Verwendung von Rhinovirusmaterial mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor zur Inhibition der Bindung von LDL-Liganden, wobei das Virusmaterial vollständige Rhinoviren, Rhinovirushüllen oder Rhinoviruskapsidpeptide mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor umfassen kann.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung von LDL-Rezeptoren, wobei eine Substanz abgeleitet aus dem Virusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor mit einer markierten Substanz gekoppelt wird, anschließend mit der entsprechenden Probe inkubiert wird und somit das Ausmaß der Bindung des Virusmaterials detektiert werden kann.

Außerdem umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur selektiven Zuführung einer therapeutischen Substanz in eine LDL-Rezeptor tragende Zelle. Hier kann Virusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor mit der therapeutischen Substanz zu einem Konjugat gekoppelt, an den LDL-Rezeptor gebunden und so die therapeutische

Substanz in die Zelle eingeführt werden.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert erläutert. Ziel der Erfindung ist ein Verfahren bereitzustellen, das es erlaubt, Substanzen zu isolieren, die die Bindung von Liganden an den LDL-Rezeptor inhibieren. Dabei dient markiertes Rhinovirusmaterial aus der sogenannten "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" als Vergleichssubstanz.

Der Begriff Ligand umfaßt alle Substanzen, die über den LDL-Rezeptor in die Zelle aufgenommen werden. Physiologische Liganden des LDL-Rezeptors sind zum Beispiel LDL (low density lipoprotein)-Partikel, die über einen Rezeptor vermittelte Endocytose in die Zelle aufgenommen werden.

Der Begriff Ligand umfaßt natürlich auch alle Rhinoviren, deren Aufnahme in die Zelle ebenfalls über den LDL-Rezeptor vermittelt wird.

Zur Durchführung des Verfahrens kann der LDL-Rezeptor in seiner löslichen Form aus dem Kulturüberstand eukaryontischer Zellen gewonnen werden.

Der Zellkulturüberstand eukaryontischer Zellen, z. B. aus HeLa-Suspensionskulturen, wird dazu auf ein Zehntel des Ursprungsvolumens konzentriert, dialysiert und saulenchromatographisch gereinigt. Zur Identifizierung des virusbindenden Proteins kann ein Filterbindungs-Assay (Mischak et al. (1988), loc. cit.) verwendet werden. Die angereicherten Fraktionen können durch präparative Gelelektrophorese unter nichtreduzierenden Bedingungen (Mischak, et al. (1988), loc. cit.) weiter gereinigt werden. Die Virus-bindenden Proteine werden dann aus dem Gel mit an sich bekannten Methoden fraktioniert und eluiert. Nach nochmaliger Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen kann das reine Protein erhalten werden. In Beispiel 1 ist die Reinigung des Proteins ausführlich dargestellt.

Das reine Protein kann einem typischen Verdau unterworfen werden. Die dabei entstehenden Peptide können über "reversed-phase"-Chromatographie aufgetrennt und mit Hilfe eines Gasphasensequenzators aminoterminal sequenziert werden (Beispiel 2). Dabei stellt sich überraschenderweise heraus, daß die erhaltenen Sequenzen mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen des humanen LDL-Rezeptors übereinstimmen (Fig. 5 und 6).

Neben der löslichen, nicht membranständigen Form kommt auch der membranständige LDL-Rezeptor als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren in Frage. Dabei kann der LDL-Rezeptor nach verschiedenen, bekannten Methoden isoliert werden (z. B. Schneider, W. J. et al. (1985), Meth. Enzymol. 109, 405—417). Außerdem steht mit Kenntnis der entsprechenden cDNA auch die Möglichkeit zur Verfügung, das Protein auf gentechnologischem Wege mit Hilfe eines des LDL-Rezeptor produzierenden Klon zu gewinnen (Yamamoto, T. et al. (1984) Cell 39, 27—38 und Dichek, D.A. et al. (1991) Somat. Cell. Mol. Genet. 17, 287—301).

Der Rezeptor kann in biologisch aktiver Form in Lösung oder gebunden an ein geeignetes Trägermaterial eingesetzt werden. Beispielsweise kann der Rezeptor an Immobilon (Fa. Millipore) oder Nitrocellulose als Trägermaterial immobilisiert werden.

Wie in Beispiel 3 beschrieben, kann das Rezeptorprotein nach Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen auf eine Immobilonmembran nach bekannten Methoden übertragen werden. Die so präparierte Membran kann dann in Gegenwart eines potentiellen Inhibitors oder einer kompetitiv wirkenden Sub-

stanz inkubiert werden. Das Ausmaß der inhibitorischen Wirkung der Substanz kann dadurch festgestellt werden, daß markiertes Rhinovirusmaterial dem Reaktionsansatz zugegeben wird.

Als Virusmaterial kann jeder Vertreter der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" bzw. davon abgeleitetes Hüllmaterial oder auch Rhinovirus-Kapsidpeptide mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor verwendet werden (Colonno, R.J. et al. (1986) J. Virol. 57, 7—12). Dazu gehören zum Beispiel die humanen Rhinoviren Serotyp 1B und 2 (HRV 1B, ATCC-Nr. VR-481 und HRV2, ATCC-Nr. VR-482). Das entsprechende Hüllmaterial kann nach aus dem Stand der Technik bekannten Methoden isoliert werden. Dazu können z. B. die Proteine des Viruskapsids aus dem Virus hergestellt werden oder entsprechende cDNA-Fragmente zur Expression gebracht werden (Skern et al. (1988)) Nucl. Acids Res. 13, 2111—2126; Sommergruber et al. (1989) Virology 169, 68—77).

Um das Virusmaterial gemäß der Erfindung einzusetzen, wird es nach aus dem Stand der Technik bekannten Methoden markiert.

Beispiele für Markierungsreagenzien sind Radioisotope, Farbstoffe, Metallchelate, Enzyme und weitere sich aus dem Stand der Technik ergebende Substanzen.

Virusmaterial kann radioaktiv markiert werden, z. B. mit <sup>35</sup>S, wobei das Ausmaß der Bindung dieses markierten Materials autoradiographisch bestimmt werden kann (Mischak et al. (1988) J. gen. Virology 69, 2653—2656).

Es ist außerdem möglich Virusmaterial mit einer fluoreszierenden Verbindung zu markieren (Reisner et al. (1988), Anal. Biochem. 26 178—179).

Genauso kann das Virusmaterial beispielsweise mit einem Hapten versehen werden und die Bindung des so markierten Virusmaterials immunologisch detektiert werden.

In Beispiel 3 wird das Verfahren erläutert. Hier wird eine LDL-Rezeptorpräparation auf eine Membran übertragen und in Gegenwart einer radioaktiv markierten Viruspräparation inkubiert. Eine Bindung kann autoradiographisch detektiert werden (Fig. 7, Spur A). In Gegenwart von Jacalin, einem Liganden des LDL-Rezeptors, wird die Bindung unterdrückt (Fig. 7, Spur B).

Damit erlaubt die Verwendung von markiertem Rhinovirusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" überraschenderweise die Detektion des LDL-Rezeptors.

Gemäß der Erfindung kann der LDL-Rezeptor natürlich auch mit Rhinovirusmaterial inhibiert werden. Die Erfindung umfaßt deshalb auch die von den Rhinoviren der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" ableitbaren Substanzen, die die Bindung seiner physiologischen Liganden (wie z. B. den LDL-Partikeln) inhibieren.

Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, die das oben genannte Virusmaterial oder deren pharmazeutisch annehmbare Salze, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen, enthalten. Diese Zusammensetzungen können parenteral oder topisch verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung des Virusmaterials und die entsprechenden pharmazeutischen Zusammensetzungen für die prophylaktische und therapeutische Behandlung des menschlichen und tierischen Körpers insbesondere bei Krankheitsbildern, die ihre Ursache in der schlechten oder nichtvorhandenen Regulierbarkeit der LDL-Rezeptorexpression bzw. der

entsprechend gestörten Bindung seiner physiologischen Liganden haben (Hypercholesterinämie, Atherosklerose).

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Bestimmung von LDL-Rezeptoren, das für die Analyse z. B. des Cholesterin-Metabolismus eingesetzt werden kann. Hier wird die entsprechende Probe mit dem markierten Virusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" versetzt und das Ausmaß und die Lokalisation der Bindung bestimmt.

Durch die überraschende Bindung des Virusmaterials aus den LDL-Rezeptor ergibt sich außerdem die Möglichkeit, Virusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" mit einer therapeutisch wirksamen Substanz zu koppeln und so die therapeutisch wirksame Substanz an ihrem Zielort — abhängig von der LDL-Rezeptorkonzentration — zuzuführen.

### Beispiele

#### 1. Reinigung des Bindungsproteins für die Rhinoviren der kleinen Rhinovirusrezeptorgruppe

200 l HeLa-Zellkulturüberstand (Fa. Computer Cell Culture Center, Mons, Belgien) wurde mittels Ultrafiltration auf 20 l konzentriert und gegen 250 l destilliertes Wasser (mit 0,02% NaN<sub>3</sub>) dialysiert. Anschließend wurde die Pufferkonzentration auf 20 mM N-Methylpiperazin, pH 4,5, eingestellt, bei 4000 Upm in der Beckman J6B Zentrifuge abzentrifugiert, über ein 0,8 µm Vorfilter filtriert und das Filtrat auf eine Anionenaustauschersäule (0,5 l Makroprep 50 Q; Biorad) geladen. Gebundenes Material wurde mit 20 mM N-Methylpiperazin, pH 4,5, 0,5 M NaCl eluiert. Das Eluat wurde mit 1 M Tris-HCl, pH 8,0, auf einen pH Wert von 7,2 eingestellt und auf eine Linscuaris Lectin-Säule (100 ml; Pharmacia) geladen; gebundenes Protein wurde mit 0,5 M α-[D]-Methylglucose in PBS eluiert, das eluierte Protein bei 50% Sättigung mit Ammoniumsulfat, pH 7,2, gefällt, der Niederschlag mit 50% gesättigter Ammoniumsulfatlösung, pH 7,2, gewaschen und in 200 ml PBS aufgenommen. Die Proteinlösung wurde auf eine Jacalinagarose Säule (40 ml; Vector-Labs) geladen und mit 120 ml 100 mM α-[D]-Methyl-Galactopyranosid in PBS eluiert. Das eluierte Protein wurde mit Ammoniumsulfat wie oben beschrieben gefällt, gewaschen, in 20 mM Methylpiperazin, pH 4,5, aufgenommen und mittels einer PD10-Säule (Pharmacia) entsalzt. Das entsalzte Material wurde in 5 Aliquots zu je 1 ml auf eine Mono Q-Anionenaustauschersäule (HR5/5; Pharmacia) geladen und mit einem Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl, 20 mM Methylpiperazin, pH 4,5 eluiert. 0,5 ml Fraktionen wurden gesammelt und mittels eines Filterbindungs-Assays auf Bindungsaktivität überprüft (Mischak et al., Virology (1988) 163, 19—25).

Die aktiven Fraktionen aus allen 5 Chromatographien wurden in einem Centricon 30 (Amicon) auf 1,5 ml eingengt und mittels präparativer Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen auf einem 7,5% Polyacrylamidgel (Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680—685) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Kupferchlorid gefärbt (Lee et al. (1987) Anal. Biochem. 166, 308—312), die dem aktiven Protein entsprechende Bande lokalisiert und ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in 0,25 M Tris-HCl, 0,25 M EDTA, pH 9,0, entfärbt und das Protein in 50 mM N-Ethylmorpholinacetat, pH 8,5, elektrophoretisch eluiert. Ein Aliquot wurde mittels des Filterbindungs-Assays wiederum auf Aktivi-

tät überprüft. Das Protein wurde dann unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, eluiert und lyophilisiert.

### Beispiel 2

#### Tryptischer Verdau und Sequenzanalyse

Das gereinigte und lyophilisierte Protein wurde in 30 µl 6 M Guanidin-HCl, 0,4 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,6, aufgenommen und mit 3 µl 45 mM Dithiothreitol versetzt und 15 min bei 56°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3 µl 100 mM Iodacetamid zugegeben und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 84 µl Wasser und 80 µl 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,6, zugegeben, die Proteinlösung mit 800 ng Trypsin (in 5 µl) unter den Bedingungen des Herstellers (Promega) versetzt und bei 37°C 18 h inkubiert. Die Lösung wurde mit 1/10 Volumen an 10% Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert, 5 min zentrifugiert und die Peptide auf einer C-18 "reversed-phase"-Säule (Baker), die mit einer 0,06% wäßrigen TFA-Lösung äquilibriert worden war, mit einem Gradienten bis 80% Acetonitril, 20% Wasser, 0,052% TFA eluiert (Fig. 1).

Die Fraktionen 20 und 33 wurden direkt mit Hilfe eines Gasphasensequenzators sequenziert, während die Fraktionen 23 bis 27 sowie Fraktion 29 und 38 unter den in den Abbildungen spezifizierten Bedingungen rechromatographiert wurden (C18 "reversed-phase"-Säule, Merck; Fig. 2, 3 und 4). Die in den Abbildungen mit "A", "D" und "F" bezeichneten Peptide bzw. die Fraktionen 33 und 20 wurden zur Sequenzierung im Gasphasensequenzator ausgewählt. Das Ergebnis ist in Fig. 5 zusammengefaßt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit denen in der "SwissProt"-Datenbank vorhandenen Proteinsequenzen verglichen. Der Vergleich ergab eine völlige Übereinstimmung mit entsprechenden Peptidsequenzen des humanen LDL-Rezeptors (Fig. 6). Die Sequenzierung der Fraktion 33 lieferte pro Abbauschritt zwei Aminosäuren. Unter Zugrundelegung der LDL-Sequenz und dem Verhältnis der in jedem Abbauschritt vorhandenen Aminosäuremengen von etwa 40% zu 60% konnte die Fraktion 33 als Gemisch zweier Peptide identifiziert werden. Auch die Sequenzen dieser beiden Peptide entsprechen Sequenzen des humanen LDL-Rezeptors. Fig. 5 zeigt die Gesamtsequenz des humanen LDL-Rezeptors (Yamamoto et al. (1984) Cell 31, 27—38), wobei die Positionen der identifizierten Peptide angegeben sind.

### Beispiel 3

#### Inhibition der Bindung von [<sup>35</sup>S]-markiertem Rhinovirus Serotyp 2 (HRV2) an den LDL-Rezeptor

Zwei Aliquots des bis zur Jacalinagarose-Chromatographie gereinigten Proteins (siehe Beispiel 1, jeweils entsprechend einer Ausgangsmenge Zellüberstands von etwa 50 ml) wurden auf ein 7,5% SDS Polyacrylamidgel (Laemmli, U.K. 1970, Nature 227, 680—685) unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Immobilonmembran (Millipore) elektrophoretisch übertragen (Mischak et al. 1988, loc. cit., Hofer et al. 1992, loc. cit.). Eine Spur wurde in Abwesenheit (Fig. 6, Spur A) oder in Gegenwart (Spur B) von 0,1 mg/ml Jacalin (Vector Labs) mit radioaktiv markiertem Rhinovirus (Mischak et al. 1988, loc. cit.) inkubiert, gewaschen,

getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert (Hofer et al. 1992, loc. cit.). Wie in Fig. 6 gezeigt, wird die Bindung des Virus an den LDL-Rezeptor unter den angegebenen Bedingungen vollständig inhibiert.

#### Legenden zu den Figuren

Fig. 1 stellt die säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide der aus dem HeLa-Zellüberstand löslichen Form des Rezeptors der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" dar. Die Peptide wurden auf einer  $\mu$ Bondapak C18,250-4 Säule unter folgenden Bedingungen aufgetrennt:

Puffer A: dest. Wasser/0,06% TFA; Puffer B: 80% Acetonitril/0,052% TFA; Flußrate: 0,5 ml/min; Gradient: 2% B bis 37,5% B von 0 bis 60 min, 37,5% B bis 75% B von 60 bis 90 min, 75% B bis 98% B von 90 bis 105 min; Temperatur: Raumtemperatur; Detektion: photometrisch bei 214 nm, 0,08 AUFS (Papiervorschub: 0,25 cm/min).

Fig. 2 Chromatographische Auftrennung der Fraktionen 23 bis 27 unter folgenden Bedingungen:

Säule: Merk Superspher 4  $\mu$ m, C18, 125-H; Puffer A: dest. Wasser / 0,1% TFA; Puffer B: Acetonitril/0,1% TFA; Flußrate: 1 ml/min, linearer Gradient von 0% B auf 70% B in 70 min; Temperatur: 30°C; Detektion: photometrisch bei 214 nm, 0,1 AUFS, Papiervorschub 1 cm/min.

Fig. 3 Rechromatographie von Fraktion 29. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Fig. 2 aufgeführt.

Fig. 4 Rechromatographie von Fraktion 38. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Fig. 2 aufgeführt.

Fig. 5 Sequenzen der analysierten Peptide (siehe auch Fig. 6):

X = Aminosäure nicht identifizierbar; tiefgestellt = Aminosäure nicht eindeutig identifizierbar.

\*: Die Sequenzierung der Fraktion 33 (Abb. 1) ergab pro Abbauschritt 2 Aminosäuren; die Peptide B und E konnten aber aufgrund der unterschiedlichen Mengen zugeordnet werden.

Fig. 6 Sequenz des LDL-Rezeptors (Yamamoto et al. (1984) loc. cit.) und Position der Peptide A—F (siehe auch Fig. 5)

Fig. 7 Inhibition der Bindung von [ $^{35}$ S]-markiertem HRV2 an den an Immobilon gebundenen LDL-Rezeptor durch Jacalin.

- A) Filterbindungstest in Abwesenheit von Jacalin  
B) wie A, aber in Gegenwart von 0,1 mg Jacalin.

#### Patentansprüche

- Verfahren zur Isolierung von Substanzen, die die Bindung von Liganden an den LDL-Rezeptor inhibieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß
  - der LDL-Rezeptor in Gegenwart einer potentiellen Inhibitorsubstanz mit
  - markiertem Rhinovirusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" inkubiert und
  - das Ausmaß der Bindung bestimmt wird.
- Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Rhinovirusmaterial Rhinoviren, Rhinovirushüllmaterial oder Rhinoviruskapsidpeptide mit Bindungsaktivität LDL-Rezeptor verwendet werden.
- Verfahren gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**,

daß das Rhinovirusmaterial vom humanen Rhinovirus Serotyp 2 (HRV2) abgeleitet ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die lösliche Form des LDL-Rezeptors aus Kulturüberständen eukaryontischer Zellen oder der aus Membranen eukaryontischer Zellen isolierte LDL-Rezeptor verwendet wird.

5. Verwendung von Rhinovirusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" zur Inhibition der Bindung physiologischer LDL-Liganden.

6. Verwendung von Rhinovirusmaterial gemäß Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß es aus den Kapsidproteinen von Rhinoviren der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" abgeleitet ist.

7. Verfahren zur Bestimmung von LDL-Rezeptoren, **dadurch gekennzeichnet**, daß

a) eine Substanz, abgeleitet von Virusmaterial aus der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor markiert wird,

b) mit der entsprechenden Probe inkubiert und

c) das Ausmaß der Bindung des markierten Virusmaterials detektiert wird.

8. Verfahren zur Zuführung einer therapeutisch wirksamen Substanz in eine LDL-Rezeptor tragende Zelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß

a) Virusmaterial der "kleinen Rhinovirus-Rezeptorgruppe" mit Bindungsaktivität zum LDL-Rezeptor mit der therapeutischen Substanz zu einem Konjugat gekoppelt wird und

b) das besagte Konjugat zu dem entsprechenden Zellmaterial gegeben, an den Rezeptor gebunden und so die therapeutisch wirksame Substanz in die Zelle eingeführt wird.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

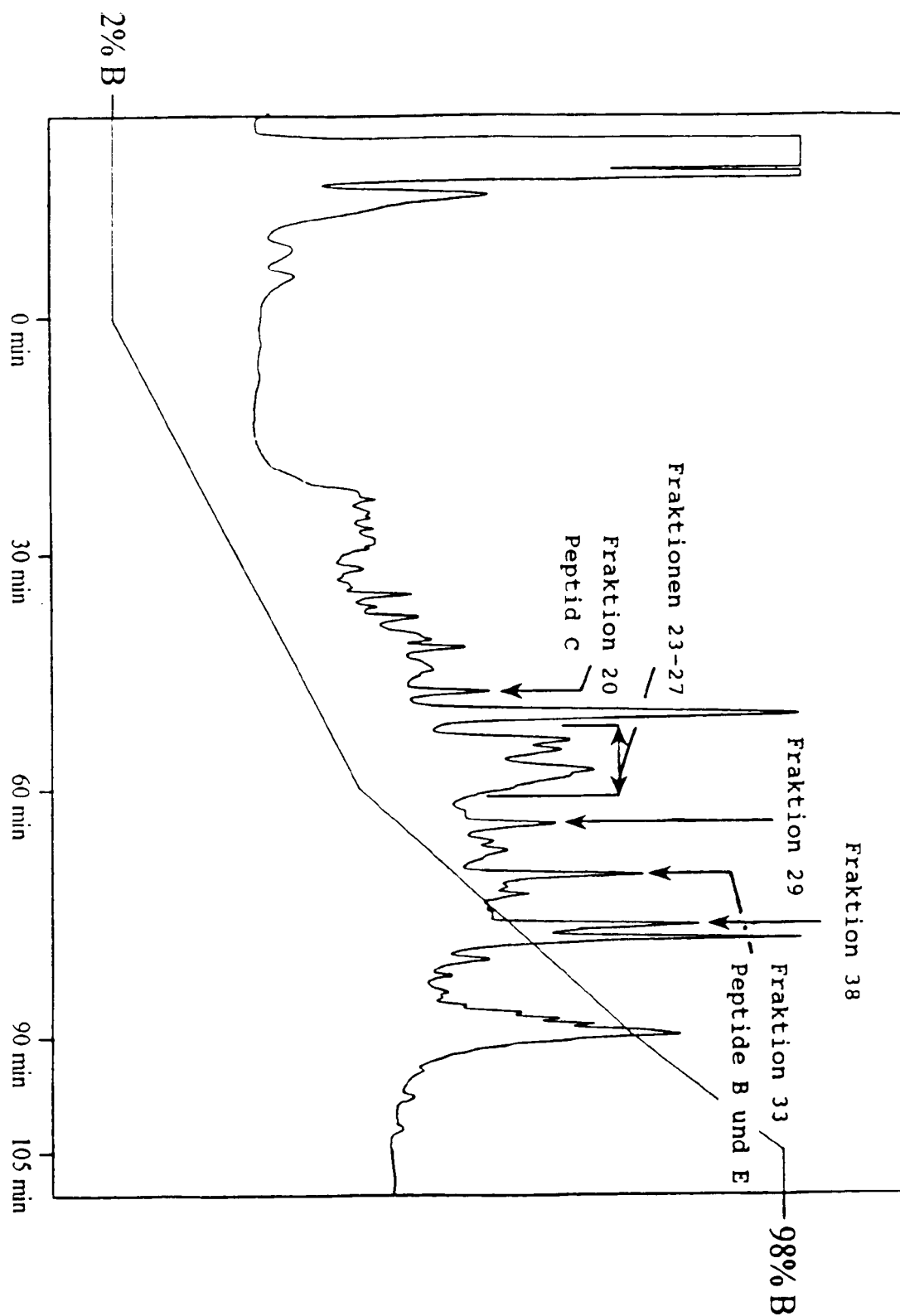


Fig. 2

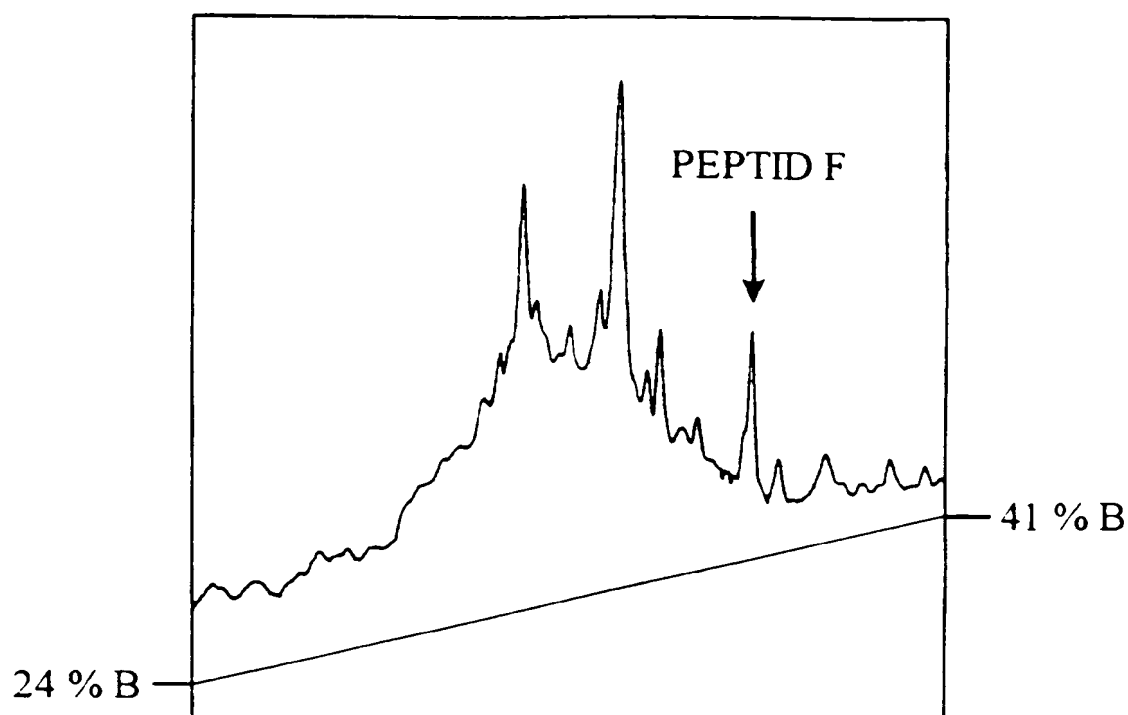


Fig. 3

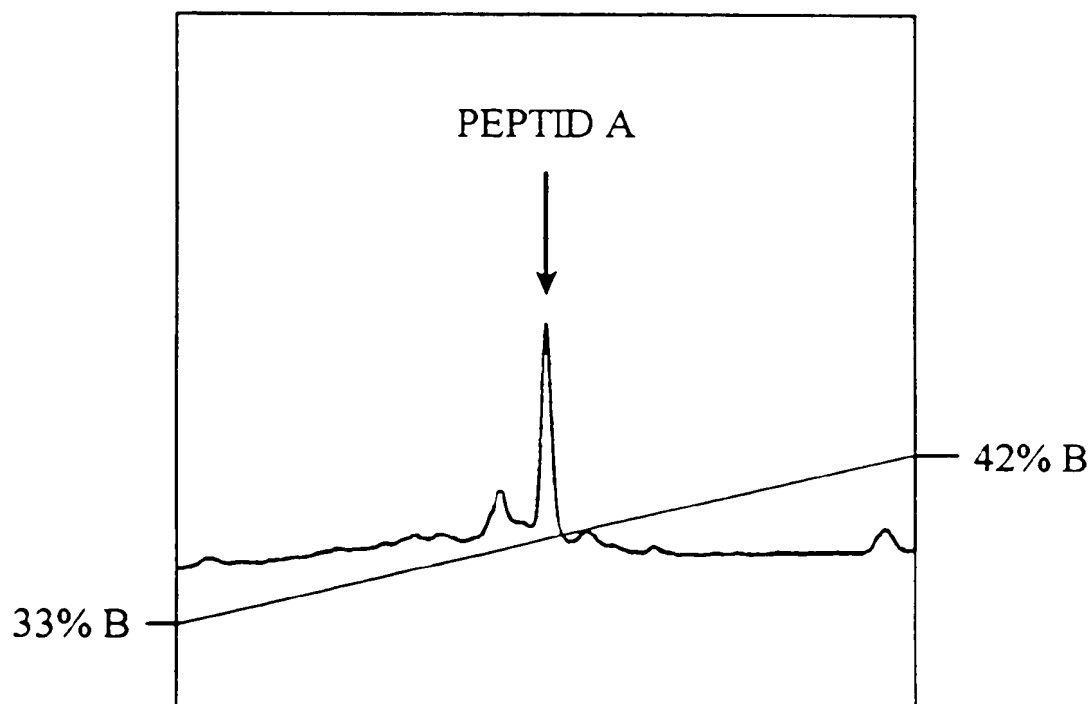




Fig. 4

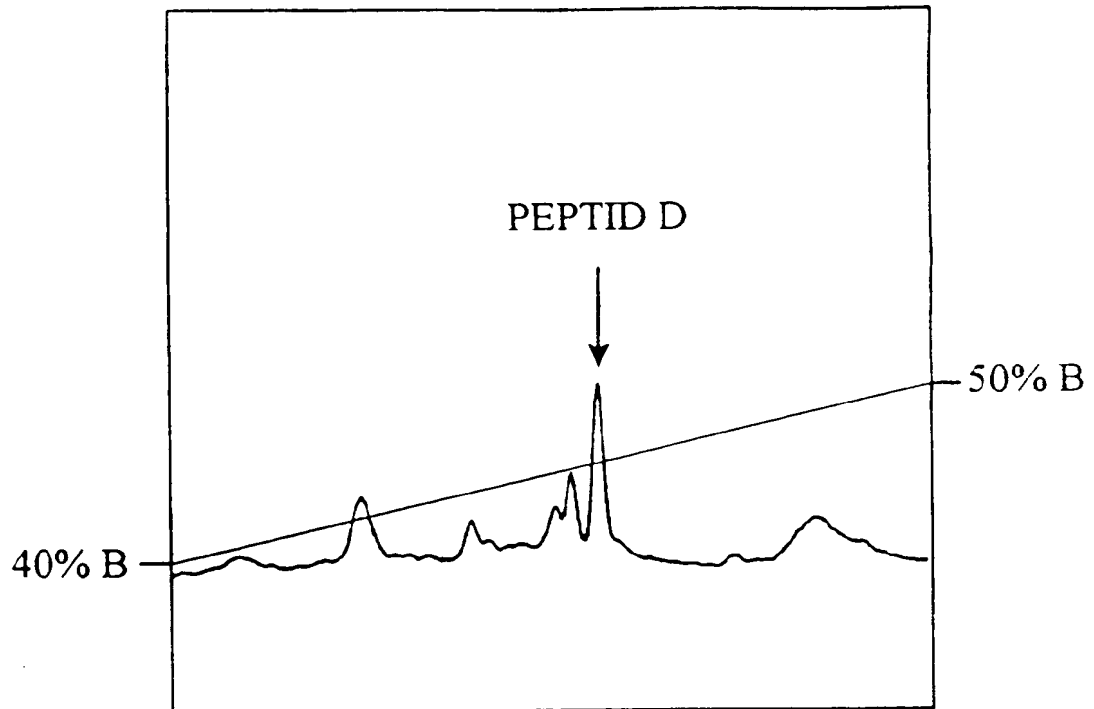


Fig. 5

Peptid	Sequenz
A	X-Leu-Tyr-Val-Phe-Gln-Gly-Asp-Ser-Ser-Pro-X <sub>Cys</sub> -X-Ala-Phe-Glu-Phe-X-X <sub>Cys</sub> -Leu-X-X-X <sub>Glu</sub> -X <sub>Cys</sub> -Ile-X <sub>His</sub> -X-X <sub>Ser</sub> -X <sub>Trp</sub> -X <sub>Arg</sub>
B*	X-Val-Gly-Ser-Ile-Ala-Tyr-Leu-Phe-Phe-Thr-Asn-X <sub>Arg</sub>
C	X-Tyr-Trp-Ser-Asp-Leu-Ser-Gln-Arg
D	Asp-Ile-Gln-Ala-Pro-X <sub>Asp</sub> -Gly-Leu-Ala-Val-X <sub>Asp</sub> -X-Ile-X-Ser-Asn-Ile-Tyr-X <sub>Trp</sub> -X-X <sub>Asp</sub> -X <sub>Ser</sub> -Val-Leu-X <sub>Gly</sub> -X-X
E*	X-Ile-Val-Val-X-Pro-Val-His-Gly-Phe-Met-Tyr-X-Thr-X <sub>Asp</sub> -X-Gly-Thr-Pro-Ala-Lys
F	X-Ala-His-Pro-Phe-Ser-Leu-Ala-Val-Phe-Gly-X-Lys

308 062/282

## Fig. 6A

10 20 30 40 50 60  
MGPWGWKLRWTVALLLAAAGTAVGDR CERNEFQCQDGK CISYKWVCDGSAECQDGSDESQ

70 80 90 100 110 120  
ETCLSVTCKSGDFSCGGRVNR CIPQFWRC DGQVDCDNGSDEQGCPPKTCSQDEF RCHD GK

130 140 150 160 170 180  
CISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLT CGPASFPQCNSSTCIPQLWACDNDPDCEDGSDEW

190 200 210 220 230 240  
PQRCRGLYVPQGDSSPCSAPEFHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDE  
(A) XLYVPQGDSSPXXAPBFXLXXXXI

250 260 270 280 290 300  
FQCS DGNCIHGSRQC DREYDCKDMSDEVGC VNVTLCEGPNKFKCHSGECITLQVCN MAR

310 320 330 340 350 360  
DCRDWSDEPIKECGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCEDIDECQD

370 380 390 400 410 420  
PDTCSQLCVNLEGGYKCQCEEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLPFTNRHEVRKMTLDRSEYT  
(B) XVGSIAYLPFTN

430 440 450 460 470 480  
SLIPNLRNVVALDTEVASNRIYWSDLSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLA  
(C) XYWSDLSQR (D) DIQAPXGLA

490 500 510 520 530 540  
VDWIHSNIYWTD SVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGPMYWTDWGTPA  
VXXIXSNIYXXXXVL (E) XIVVXPVHGPMYXTXXGTPA

# Fig. 6B

550 560 570 580 590 600  
KIKKGGLNGVDIYSLVTENIQWPNGITLDLLSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGGNRKTILE  
K

610 620 630 640 650 660  
DEKRLAHPFSLAVFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVLPHNLTO  
(F) XAHPFSLAVPEKK

670 680 690 700 710 720  
PRGVNWCERTTSLNGGCQYLCLPAPQINPHSPKPTCACPDGMLLARDMRSLTEAEAAVA

730 740 750 760 770 780  
TQETSTVRLKVSSTAVRTQHTTTTRPVPDTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALGDVAGRG

790 800 810 820 830 840  
EKKPSSVRALSIVLPIVLLVFLCLGVFLWKNWRLKNINSINPDNPVYQKTTEDEVHICH

850 860  
NQDGYSYPSRQMVSLDDVA

Fig. 7

